Archive of SID

علمی و ترویجی

مجله گیاهپزشک و غذا، شماره ۲، فروردین- اردیبهشت ۱۳۸۷

اهمیت و نقش آفلاتوکسین در پسته با تکیه بر ردیابی ژن‌های درگیر در تولید و مسیر بیوسنتز آن

*میرمعصوم عراقی[۱]، معصومه مصطفی[۲] و کامران رهنما[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی و[۳] دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه صنعتی اصفهان

* پست الکترونیکی: Iraqi602@yahoo.com

چکیده

پسته با نام علمی *Pistacia vera* L. گیاهی نیمه گرمسیری از خانواده پسته یا کازو (Anacardiaceae) است. با توجه به اینکه سطح نسبتاً وسیعی از کشور در مناطق کویری واقع شده و دارای شرایط نامساعدی مانند شوری آب و خاک و کم آبی می‌باشد، کشت پسته به‌عنوان یک گیاه مقاوم بسیار مورد توجه قرار گرفته است. سطح زیر کشت و آمار موجود مربوط به صادرات این محصول نشان می‌دهد که پسته در میان محصولات باغی از اهمیت اقتصادی زیادی برای ایران برخوردار بوده و این در حالی است که در مراحل مختلف تولید پسته از مزرعه تا انبار میکروارگانیسم‌های مختلفی از جمله قارچ‌ها، با فعالیت روی میوه پسته سبب کاهش کیفیت و بالطبع کاهش بازارپسندی این محصول شده‌اند. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که فلور قارچ اصلی روی میوه پسته آسپرژیلوس و گونه غالب *Aspergillus niger* است. اگرچه گونه‌های آسپرژیلوس جزء کپک‌های انباری نامیده می‌شوند، لیکن جدایه‌های *A. niger* قادر به تولید پکتیناز و کوتیناز نیز هستند. بنابراین علاوه‌بر خاصیت ساپروفیتی، اندکی نیز حالت تهاجمی دارند و قادرند در شرایط مناسب مزرعه به دانه‌های در حال رشد نیز حمله کرده و میکوتوکسین تولید کنند. میکوتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات سمی هستند که توسط گونه‌های متعددی از قارچ‌ها از جمله آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی‌سیلیوم تولید می‌شوند که سالانه روی ۲۵ درصد از محصولات کشاورزی و مواد غذایی دنیا اثر نامطلوب می‌گذارند.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، انواع آسپرژیلوس، قارچ، پسته

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها که گروهی از فورانوکومارین‌های مشتق شده از پلی‌کتیدها هستند سمی‌ترین و سرطان‌زاترین ترکیبات شناخته شده در بین میکوتوکسین‌ها هستند که با برخی از گونه‌های آسپرژیلوس مانند *A.flavus , A. Parasiticus, A. nomius, A. ochraceoroseus* تولید می‌شوند (۱ و ۲). علاوه‌بر این بیش از ۵۰ گونه دیگر از قارچ‌های رشته‌ای شامل چندین گونه از *Penicillium* و *Chaetomium* نیز آفلاتوکسن تولید

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کنند (۳). آفلاتوکسین‌ها به‌دلیل تأثیرهای مختلف بیوشیمیایی (اثر روی متابولیسم انرژی، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و چربی و سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک) و بیولوژیکی (سرطان‌زایی، جهش‌زایی، ایجاد مسمومیت‌های کلیوی و کبدی و تضعیف‌کنندگی سیستم ایمنی) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند.

آفلاتوسین ترکیبی جهش‌زا است و سیستم ایمنی بدن را ضعیف می‌کند. آفلاتوکسین با تشکیل یک نوع آپوکسید در موجودات خون گرم سمیت حاد و مزمن ایجاد می‌کند و حیواناتی که قادر به تولید آن نیستند در مقابل بروز هر نوع مسمومیت نسبتاً مقاوم می‌باشند. خطرات بالقوه آلودگی تولیدات زراعی و باغی مانند ذرت و پسته به آفلاتوکسین موجب نگرانی‌هایی در وضعیت بهداشت عمومی کشورهای مختلف جهان شده است (۷). آلودگی میوه‌های پسته به قارچ‌های تولیدکننده این توکسین (*A.niger* و *A. Parasiticus*) از باغ‌ها شروع شده و پس از برداشت در موقع درجه‌بندی پسته‌ها با آب، میزان آلودگی به اسپور قارچ‌های مزبور به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. اسپور قارچ‌های *A. flavus* پس از خشکاندن پسته در آفتاب حداقل تا چهار ماه بعد قادر به جوانه‌زنی و تولید توکسین می‌باشد. آفلاتوکسین‌ها دارای یک هسته کومارینی هستند که با یک بی‌فوران ترکیب شده و بنابراین جزء ترکیب‌های دی‌فورانوکومارین قرار می‌گیرند (۸). آفلاتوکسین‌ها براساس ساختمان شیمیایی به دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند:

۱. دیفوروکوماروسیکلوپنتون، شامل آفلاتوکسین‌های M_1 , B_{2a} , B_2 , B_1 و M_2.

۲. دیفوروکومارولاکتون، شامل آفلاتوکسین‌های G_1 و G_2

مسیر بیوسنتز شیمیایی آفلاتوکسین شامل ۲۳ واکنش آنزیمی برای تبدیل استیل کوانزیم A به محصول نهایی می‌باشد. ۱۵ ماده حد واسط نیز در این مسیر شناسایی شده است (۵ و ٦). شناسایی و تشخیص بیوشیمیایی آنزیم‌های دخیل در چرخه متابولیتی بیوسنتز آفلاتوکسین به جداسازی ژن‌های مسئول در تولید این آنزیم‌ها وابسته است. تعداد ۲۵ ژنی که در بیوسنتز آفلاتوکسین شرکت دارند در ناحیه ۷۵ کیلوبازی از DNA برروی کروموزوم گروه‌بندی شده‌اند. بیان این ژن‌ها هنگامی آغاز می‌شود که رشد اولیه کند یا متوقف شود. به‌طور متوسط هر ۲/۸ کیلوباز از DNA کروموزومی شامل یک ژن است. در بین این ژن‌ها ژن‌های بزرگی در حدود ۷-۵ کیلوباز وجود دارد که کد کننده سنتز کننده‌های زیرواحدهای آلفا و بتا اسیدهای چرب و پلی‌کتیدسینتاز می‌باشند. در انتهای $5'$ توالی گروه ژنی در حدود ۲ کیلوباز از DNA، ORF غیرقابل شناسایی قرار دارد. این توالی به‌نظر می‌رسد که مشخص‌کننده انتهای خوشه ژنی باشد. انتهای $3'$ این گروه ژنی به‌وسیله یک گروه چهار ژنی تولیدکننده قند محدود می‌شود (٦). گروه ژن‌های هضم قند در انتهای پایین‌دست و چسبیده به گروه ژن‌های تولیدکننده آفلاتوکسین قرار گرفته‌اند و ممکن است از بعضی جهات در تنظیم گروه ژنی نقش داشته باشند. نقش *aflR* در تنظیم تولید آفلاتوکسین به اثبات رسیده است (۸). این ژن اختصاصی تنظیم‌کننده مسیر تولید آفلاتوکسین، سبب فعال شدن رونویسی اکثر ژن‌ها می‌شود. این ژن در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین یک تنظیم‌کننده مثبت است. اضافه کردن یک نسخه دیگر از این ژن سبب تولید مضاعف

www.SID.ir

Archive of SID

مواد حد واسط در بیوسنتز آفلاتوکسین می‌شود. رونویسی ژن‌های مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین با اتصال پروتئین AFLR به توالی پالیندرومیک (5′-TCGN ٥AGC-3′) در ناحیه پروموتور ژن‌های ساختمانی در *A. flavus* فعال می‌شود.

علاوه‌بر این ژن، ژن‌های دیگری نیز در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین یافت شده‌اند. *aflT* که یک پروتئین متصل شونده به غشاء را کد می‌کند که به‌نظر می‌رسد این ژن در ترشح آفلاتوکسین مؤثر باشند (٨)، *moxY ,cypA ,cypX* و *ordB* که عمل این ژن‌ها هنوز ناشناخته است. با تعیین توالی ژن‌های درگیر در بیوسنتز آفلاتوکسین و پیشرفت تکنیک PCR و RT-PCR محققین با طراحی آغازگرهای مربوط به ژن‌ها به بررسی ارتباط بین حضور این ژن‌ها و تولید توکسین پرداخته‌اند (٦). هر چند مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین شناخته شده است، شواهد متعددی مبنی بر تاثیر عوامل فیزیولوژیکی در تولید آفلاتوکسین و نقش تنظیم‌کنندگی آنها به‌خصوص در سطح بیان ژن وجود دارد. به‌نظر می‌رسد که مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین با چندین مکانیسم به هم پیوسته شامل عناصر تنظیم‌کننده رونویسی و عوامل فیزیولوژیکی تاثیرگذار روی متابولیسم قارچ کنترل می‌شود.

عوامل فیزیکی موثر شامل دما و pH می‌باشد. عوامل غذایی مانند منبع کربن و نیتروژن هم روی تولید میکوتوکسین تاثیرگذار است. همچنین شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه مراحل مختلف رشد قارچی مانند اسپوردهی و تشکیل اسکلروت با تولید متابولیت‌های ثانویه در ارتباط است و شرایط محیطی مورد نیاز برای متابولیسم ثانویه با شرایط مورد نیاز برای اسپوردهی مشابه است.

از بین بردن آلودگی آفلاتوکسینی در مرحله پس از برداشت تاکنون به شیوه‌ها و روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و یا بیولوژیکی از جمله غیرفعال‌سازی فیزیکی یا شیمیایی آفلاتوکسین‌ها انجام گرفته است. مجتهدی در سال ١٩٧٨ و دانش در سال ١٩٧٩ به این نتیجه رسیدند که برنامه‌های پیشگیری از آلودگی پسته‌ها به آفلاتوکسین باید در مراحل مختلف برداشت، بعد از برداشت، خشک کردن، نگهداری بعد از خشک کردن، فراوری، انبارداری، انتقال و فروش اعمال شود، با این همه پیشگیری از آلودگی پیش از برداشت مانند مبارزه با حشرات در طول دوره رشد، عدم کشت ارقام خندان یا زود شکاف و به‌کارگیری روش‌های به‌نژادی، احتمالاً بهترین و متداول‌ترین راهبرد کنترل آفلاتوکسین به‌شمار می‌آید (٤ و ٥). زیرا *A. flavus* در واقع تمامی محصولات را پیش از برداشت آلوده می‌کند. اتخاذ روش‌های مورد استفاده برای حذف این میکوتوکسین از محصولات نیاز به درک صحیح مکانیزم‌های کنترل در بیوسنتز آن در سطح مولکولی دارد. به‌دلیل آلودگی قابل توجه میوه‌های پسته تولیدی ایران در سال‌های گذشته به آفلاتوکسین و اهمیت اقتصادی آن در بهداشت عمومی و نیز صادرات این محصول ضروری است (٢) روش‌های مناسبی برای آگاهی از سطح آلودگی آفلاتوکسین در مواد غذایی اتخاذ شود که این تنها با استفاده از روش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه‌وتحلیل دقیق امکان‌پذیر است. بیشتر روش‌های به‌کار گرفته شده ماهیت فیزیکوشیمیایی دارند درحالی‌که روش‌های بیولوژیکی در استفاده و اهمیت سطوح متفاوتی دارند. برخی روش‌ها مانند کروماتوگرافی لایه نازک تنها نشان‌دهنده آلودگی ماده به میکوتوکسین است و برخی از روش‌ها مانند الیزا و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا کمیت توکسین را تعیین می‌کند.

منابع

۱. رحیمی، پ. ۱۳۸٤. ردیابی ژن‌های دخالت‌کننده در تولید آفلاتوکسین در گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از پسته. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی. دانشگاه صنعتی اصفهان.

۲. علوی، س. ا. ۱۳۸۳. مایکوتوکسین‌ها در کشاورزی و امنیت غذایی. نشر کشاورزی.

۳. علامه، ع و رزاقی‌ابیانه، م. ۱۳۸۰. مایکوتوکسین‌ها. دانشگاه امام حسین (ع). تهران. شماره ۱۱۰، ٦۷۸ صفحه.

٤. مجتهدی، ح.، دانش. د.، حقیقی. ب. و فتحی. ش. ۱۳۵۹. رطوبت نسبی انبار در رفسنجان و بررسی امکان آلودگی پسته‌ها با سم آفلاتوکسین پس از برداشت. بیماری‌های گیاهی.

5.Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., and Keller, N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Boil. Rew*. 66: 447-459.

6.Ehrlich, K.C., Montalbano, V.G., and Cotty, P.J. 2003 sequence comparison of *aflR* from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of Aflatoxin production. *Fungal Gnetics Biol*. 39: 63-74.

7.Feng, G.H., and Leonard, J. 1998. Culture conditions control expressions of the genes for aflatoxin and sterigmatocystinbiosynthesis in As*pergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl. Microbial. Biotech*. 2227-2275.

8.Flaherty, J.E., and Payne, G.A. 1997. Overexpression of *aflR* leads to up regulation of pathway and increased Aflatoxin production in *A . flavus*. *Appl. Environ*. *Microbiol*. 63: 3995-4000.

www.SID.ir